

Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L.

Sílvia Rubin¹, Cláudia Simone Madruga Lima², Juliana de Magalhães Bandeira¹, Márcia Vaz Ribeiro¹, Letícia Carvalho Benitz¹, José Antônio Peters³ e Eugênia Jacira Bolacel Braga³

Introdução

Plantas com propriedades medicinais e aromáticas vêm sendo utilizadas há séculos por várias populações com a finalidade de melhorar a qualidade de vida da população [1]. A cultura de tecidos vegetais é empregada para a manutenção do germoplasma, bem como a propagação comercial de plantas medicinais [2]. A micropropagação objetiva a obtenção de mudas com qualidades agrônomicas desejáveis, indexadas, livres de patógenos e, com elevado padrão genético para síntese de metabólitos secundários e/ou produção de óleos essenciais para o emprego na indústria farmacêutica [2].

Conforme Torres *et al.*, [3], o acréscimo de reguladores de crescimento ao meio de cultivo é utilizado para suprir possíveis deficiências endógenas e melhorar as características de cultivo *in vitro*. O BAP (6-benzilaminopurina) é adicionado ao meio de cultura para melhorar a micropropagação, com aumento no número de gemas, folhas e brotos, e para induzir um acréscimo na produção de massa fresca e qualidade das plantas cultivadas. O ANA (ácido α -nftalenoacético) adicionado ao meio, tende a inibir o crescimento normal da parte aérea, porém, é empregado amplamente em associação com o BAP, pois a apropriada interação entre ambos pode favorecer ainda mais a qualidade das plantas micropropagadas [3].

O tomilho (*Thymus vulgaris* L.) é uma planta condimentar, aromática e medicinal. Suas folhas e ramos jovens são amplamente empregados na culinária como condimento. Esta planta também é utilizada na indústria de perfumes e como aromatizante natural de licores. O timol, componente de seu óleo essencial, é importante ingrediente de cremes dentais. Contudo, é tradicionalmente utilizado na medicina popular como adstringente, expectorante, digestivo, antiespasmódico, antitussígeno, antisséptico e antifúngico [4].

Pela importância medicinal e econômica do tomilho, o presente estudo teve por objetivo estabelecer as melhores concentrações e combinações de fitorreguladores adicionados ao meio de cultivo *in vitro*, almejando a obtenção de plantas com melhores qualidades morfológicas e fisiológicas para posterior aclimatização e comercialização das folhas como condimentos.

Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de

Cultura de Tecidos de Plantas, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pelotas.

Como fonte de explante, utilizou-se segmentos nodais de aproximadamente 1cm de comprimento, provindos de plantas pré-estabelecidas em meio MS [5] contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e 100 mg L⁻¹ de mio-inositol. Os tratamentos constaram da combinação de três concentrações de BAP (0, 1 e 2 mg L⁻¹) e três de ANA (0, 0,25 e 0,5 mg L⁻¹), adicionadas ao meio MS com 30 g L⁻¹ de sacarose e 100 mg L⁻¹ de mio-inositol. Em seguida o pH foi ajustado para 5,8 e os meios autoclavados a 121° C com pressão de 1,05 kg cm⁻² por 20 minutos. Os frascos, contendo os explantes, foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2°C, densidade de fluxo de fótons de 40 μ mol m⁻² s⁻¹, provida por lâmpadas fluorescentes branca-fria e fotoperíodo de 16 h. Após 40 dias de cultivo *in vitro*, os parâmetros avaliados foram a média da altura, números de brotos, folhas, entrenós e gemas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituindo de um esquema fatorial 3x3, com cinco repetições, sendo cada uma, representada por um frasco contendo quatro explantes. Os dados analisados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Através deste trabalho, verificou-se a ocorrência de interação entre as variáveis independentes ANA e BAP para todas as variáveis dependentes analisadas, com diferença significativa entre as médias de cada uma.

Constatou-se que o emprego de ANA sem a adição de BAP foi favorável ao alongamento da parte aérea, sendo esta característica almejada na fase inicial de experimentação.

Para a altura das plantas e número de gemas, a maior média foi obtida no tratamento com 0,25 mg L⁻¹ de ANA sem adição de BAP, evidenciando que, presença de BAP provocou um déficit do alongamento da parte aérea e na formação de gemas (Tab. 1 e 5). Para a variável número de brotos, observou-se que a maior média foi obtida no tratamento sem a adição de reguladores (Tab. 2).

Os dados observados correspondentes ao número de entrenós e folhas, apresentaram melhores resultados com 0,5 mg L⁻¹ de ANA sem a adição de BAP. A presença desta citocinina no meio de cultivo provocou um

1. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. Capão do Leão, RS. Caixa Postal 354, CEP 96010-900. E-mail: rubinufpel@yahoo.com

2. Aluna da Faculdade de Agronomia - FAEM - Universidade Federal de Pelotas, Bolsista de Iniciação Científica - Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas - Departamento de Botânica, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

3. Professor Adjunto do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Apoio financeiro: CAPES e FAPERGS.

decréscimo nas médias (Tab. 3 e 4).

As citocininas utilizadas durante a fase de propagação *in vitro*, de forma geral, promovem desenvolvimento da parte aérea, mas seu excesso pode ser tóxico e levar ao encurtamento dos entrenós [7 e 8].

Conforme Pérez-Toreno [9], os efeitos decorridos do balanço entre os diferentes hormônios de crescimento sobre o desenvolvimento *in vitro* depende do genótipo testado, tornando necessário o estudo individualizado para cada espécie ou cultivar.

Segundo Donini *et al.* [10], na multiplicação de *Ocimum basicum* L., o melhor meio para o cultivo *in vitro* desta espécie apresentou apenas ANA como regulador do crescimento, não havendo, por tanto, a necessidade de BAP.

Nayak e Sen [11] relataram alta frequência de formação de brotos em explantes de *Ornithogalum umbellatum*, uma planta medicinal, em MS suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de ANA e 1,0 mg L⁻¹ de BAP.

Han *et al.*, [12], obteve maior formação de brotos de explantes de *Lilium longiflorum* em meio contendo 2,2 µM de BAP e 2,9 µM de AIA (ácido indol acético).

Beduhn [13], observou no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* e *Mentha piperita*, que o desenvolvimento de brotos e segmentos nodais foram melhores com 2 mg L⁻¹ de BAP na ausência de ANA. Já em relação a altura, para *Melissa officinalis*, não houve resultados com diferenças significativas, porém, para *Mentha piperita* a altura atingiu maiores proporções com 0,25 mg L⁻¹ de ANA e ausência de BAP, dados que coincidem com os fornecidos pelo presente trabalho.

Contudo, para *Anthemis nobilis*, Souza [14] observou que não houve diferença estatística significativa na interação entre as concentrações de BAP e de ANA utilizadas quanto ao número de folhas, afirmando que apenas ANA apresentou efeitos significativos, sendo que a ausência do mesmo possibilitou a maior produção de folhas por explante.

Silva *et al.* [15], constataram que melhores resultados para o peso da matéria fresca da parte aérea foram obtidos com plantas cultivadas na ausência de BAP, demonstrando que BAP pode exercer efeitos negativos no crescimento da parte aérea.

Lane [7] e Leshem *et al.* [8], afirmam que citocininas acima do efeito desejado é prejudicial para o desenvolvimento da planta.

Conclusão

Os resultados possibilitaram concluir que baixas concentrações de ANA sem a adição de BAP no meio de cultivo é favorável para a multiplicação *in vitro* de plantas de tomilho, proporcionando características

morfológicas e fisiológicas desejáveis para a sua comercialização.

Referências

- [1] CUNHA A. P. da 2005 [Online]. *Aspectos Históricos sobre Plantas Medicinais, seus Constituintes Ativos e Fitoterapia*. Hompeige: <http://www.antoniopecunha.com.sapo.pt/>
- [2] FRANÇA, S. de C. 2004. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O. (coord.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª ed., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora. da UFSC. p.123-146.
- [3] TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. 1998. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Volume I, Brasília-DF: EMBRAPA/CBAB. 509 p.
- [4] LORENZI, A. e MATOS, F. J. A. 2002. *Plantas Medicinais no Brasil, Nativas e Exóticas*. Nova Odesa-SP, Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 512p.
- [5] MACEDO, C. E. C. de; SILVA, M. G. da; NÓBREGA, F. S. da; MARTINS, C. P.; BARROSO, P. A. V.; ALLOUFA, M. A. I. 2003. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananás comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. Jaboticabal-SP. *Revista Brasileira Fruticultura*, 3: 501-504.
- [6] MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture tissues. *Physiological Plant*, 15: 473-497.
- [7] LANE, W.D. 1979. Regeneration of pear plants from shoot meristem: tips. *Plant Science Letters*, 16: 337-342.
- [8] LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALER, D.P. 1988. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. *Annals of Botany*. 62: 271-276.
- [9] PÉREZ-TONERO, O.; EGEA, J.; VANOOSTENDE. 2000. A. Assesment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. *Plant Science*, 158: 61-70.
- [10] DONINI, L.P.; FERREIRA-MOURA, I.T.; SOUZA, J.A. GUISSO, A.P.; PEREIRA-BARBOSA. L. ROSA, D.L. da; VIÉGAS, J. 2004. In: BEDUHN, F.A. 2005. *Estabelecimento e propagação in vitro de plantas medicinais da família Lamiaceae*. Dissertação de Mestrado, Curso de pós-graduação em Fisiologia Vegetal, UFPel, Pelotas, 58p.
- [11] NAYAK S, SEN S. 1995. *In vitro* propagation of *Ornithogalum umbellatum* through direct organogenesis. In: Rout, G.R.; Samantaray, S.; Das, P. 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, 18: 91-120.
- [12] HAN, B.H; YU, H.J; YAE, B.W.; PEAK, K.Y. 2004. *In vitro* micropropagation of *Lilium longiflorum* 'Georgia' by shoot formation as influenced by addition of liquid medium. *Scientia Horticulturae*, 103: 39-49.
- [13] BEDUHN, F.A. 2005. *Estabelecimento e propagação in vitro de plantas medicinais da família Lamiaceae*. Dissertação de Mestrado, Curso de pós-graduação em Fisiologia Vegetal, UFPel, Pelotas, 58p.
- [14] SOUZA, J. A. 2004. *Cultivo in vitro e caracterização isoenzimáticas de espécies de camomila*. Dissertação de Mestrado, Curso de pós-graduação em Fisiologia Vegetal, UFPel., Pelotas, 48 p.
- [15] SILVA, S.; SATO, A.; ESQUIBEL, M. A.; LAGE, C.L.S. 2001. Produção de mudas de *Melissa officinalis* L. Goiânia-GO: *Red Bio. Anais do Congresso Ibero-americano de biotecnologia vegetal*, p. 74.

Tabela 1: Altura média das plantas (cm) de *Thymus vulgaris*, cultivadas *in vitro*, por 40 dias com diferentes concentrações de ANA e BAP

Concentração de ANA (mg L ⁻¹)	Concentração de BAP (mg L ⁻¹)		
	0	1	2
0	3,36 b A	2,02 a A	1,96 a A
0,25	5,50 a A	1,54 a B	1,82 a B
0,5	5,28 a A	1,88 a B	1,78 a B

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 2: Número médio de brotos das plantas de *Thymus vulgaris*, cultivadas *in vitro*, por 40 dias com diferentes concentrações de ANA e BAP

Concentração de ANA (mg L ⁻¹)	Concentração de BAP (mg L ⁻¹)		
	0	1	2
0	2,60 a A	1,20 a B	2,20 a AB
0,25	1,00 b A	1,00 a A	1,20 ab A
0,5	2,00 ab A	1,00 a A	1,00 b A

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 3: Número médio de entrenós das plantas de *Thymus vulgaris*, cultivadas *in vitro*, por 40 dias com diferentes concentrações de ANA e BAP

Concentração de ANA (mg L ⁻¹)	Concentração de BAP (mg L ⁻¹)		
	0	1	2
0	4,64 a A	3,54 a A	4,00 a A
0,25	5,30 a A	3,60 a AB	2,60 a B
0,5	5,62 a A	2,60 a B	2,98 a B

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 4: Número médio de folhas das plantas de *Thymus vulgaris*, cultivadas *in vitro*, por 40 dias com diferentes concentrações de ANA e BAP

Concentração de ANA (mg L ⁻¹)	Concentração de BAP (mg L ⁻¹)		
	0	1	2
0	17,00 a A	13,34 a A	10,14 a A
0,25	21,42 a A	7,42 a B	8,62 a B
0,5	23,26 a A	4,8 a B	8,52 a B

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 5: Número médio de gemas das plantas de *Thymus vulgaris*, cultivadas *in vitro*, por 40 dias com diferentes concentrações de ANA e BAP

Concentração de ANA (mg L ⁻¹)	Concentração de BAP (mg L ⁻¹)		
	0	1	2
0	7,86 b A	4,00 a B	4,04 a B
0,25	13,70 a A	4,04 a B	2,62 a B
0,5	5,90 b A	1,20 a B	1,76 a B

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.